



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

FRANCINALDO RIBEIRO SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
EXTRATOS DE *Annona muricata* L. (Annonaceae)**

CAMPUS I
CAMPINA GRANDE – PB
2011

FRANCINALDO RIBEIRO SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
EXTRATOS DE *Annona muricata* L. (Annonaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de Artigo Científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dr^a Raïssa Mayer Ramalho Catão

CAMPUS I
CAMPINA GRANDE – PB
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

S586a Silva, Francinaldo Ribeiro.
Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de
Annona Muricata L. (Annonaceae) [manuscrito] /
Francinaldo Ribeiro Silva. – 2011.
17 f : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.
“Orientação: Profa. Dra. Raissa Mayer Ramalho
Catão, Departamento de Farmácia”.

1. Microbiologia. 2. Microorganismos - Bactérias. 3.
Resistência microbiana. I. Título.


21. ed. CDD 579

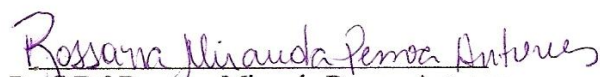
FRANCINALDO RIBEIRO SILVA

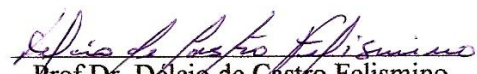
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
EXTRATOS DE *Annona muricata* L. (Annonaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de Artigo Científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 02 de agosto de 2011.


Prof^a Dr^a Raissa Mayer Ramalho Catão
UEPB/CCBS/Departamento de Farmácia
ORIENTADORA


Prof^a Dr^a Rossana Miranda Pessoa Antunes
UEPB/CCBS/Departamento de Farmácia
EXAMINADORA


Prof Dr. Délcio de Castro Felismino
UEPB/CCBS/Departamento de Biologia
EXAMINADOR

DEDICATÓRIA

A toda minha família, pelo investimento, dedicação, confiança e amizade, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Mestre Jesus, pela dádiva da vida e todas as graças alcançadas.

Ao meu Guia Espiritual pela proteção, sempre estando comigo em todos os momentos, ajudando-me a cada dia no meu processo de evolução.

À minha querida mãe Maria de Fátima e minhas avós Maria Garcia e Valdeci Maria por acreditarem no meu sucesso profissional e por todo investimento depositado ao longo desses cinco anos de graduação.

Ao meu pai José Adailton, meus irmãos Odair e Filipe, e minhas tias Ana Lúcia e Irene, sempre tão presentes em minha vida.

À minha orientadora Raïssa Catão pela confiança e por aceitar-me como seu orientando. Agradeço por seus ensinamentos e amizade, que levarei por toda minha vida.

À professora Rossana Miranda por sua dedicação, paciência e por ter me ajudado na preparação dos extratos da planta.

À professora Vanda Lúcia, por ela ter me dado a oportunidade de ser seu orientando na Iniciação Científica de 2009.

A toda minha turma de Farmácia 2007.1, em especial os amigos Deysiane, Fernando, Nathália, Renata, Thiago e João Paulo pelos momentos de amizade, união e alegria ao longo do curso.

Aos meus colegas de apartamento, em especial à Bruna Alves e ao Paulo Sérgio pelo companheirismo e paciência, os quais me ajudaram muito nesses anos de convivência juntos.

Aos meus professores de forma geral, por suas contribuições na transmissão de conhecimentos, com o objetivo de nos tornarmos profissionais qualificados.

Aos funcionários da UEPB, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

A todos aqueles, que apesar de não terem sido citados acima, contribuíram direta ou indiretamente na conclusão da minha graduação, os meus sinceros agradecimentos.

“Lembre-se sempre de olhar as coisas de uma outra maneira, o mundo parecerá diferente.
Se não acreditar; veja.
Quando pensar que sabe algo, olhe de outra forma.
Mesmo que pareça tolo ou errado, deve tentar.
Nunca considere só o que pensa o autor do escrito,
Considere o que você pensa.
Tente encontrar a sua própria voz.
Quanto mais demorar para procurar, mais improvável será que encontre.
Não se resigne. Liberte-se.
Não fique num canto, olhe a sua volta.
Ouse ir buscar novos campos”.

(Sociedade dos Poetas Mortos)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado na forma de Artigo Científico, seguindo as normas da Revista de Biologia e Farmácia – BIOFAR (ISSN 1983-4209).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE *ANNONA MURICATA* L. (ANNONACEAE)

*Francinaldo Ribeiro Silva*¹; *Raïssa Mayer Ramalho Catão*²; *Rossana Miranda Pessoa Antunes*²

RESUMO – Atualmente observa-se um grande índice de micro-organismos que se tornaram resistentes à terapia convencional, essa resistência tende a aumentar com o uso inadequado de antimicrobianos. Isso fez com que a pesquisa de novas substâncias ativas fosse intensificada. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* de extratos hidroalcolólicos e aquosos da casca, folhas e fruto da *Annona muricata* L. (graviola) frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antibacteriana dos extratos da graviola foi determinada por difusão em placa com Ágar Mueller-Hinton usando o método de difusão em disco frente a cepas testadas. Os discos de papel foram impregnados com 20 µL dos extratos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%. Os ensaios foram realizados em duplicata e as placas ficaram incubadas em estufa por 37°C/24h, sendo as leituras realizadas após este período através da medição dos halos de inibição de crescimento. Verificou-se que os extratos hidroalcolólicos e aquosos mostraram-se ineficazes frente aos micro-organismos nas diluições testadas. Sugere-se o desenvolvimento de novos estudos utilizando outros métodos de difusão do extrato vegetal, bem como a utilização de extratos obtidos com outros solventes frente a fungos e outras cepas bacterianas.

Unitermos: Resistência microbiana, graviola, hidroalcolólicos, aquosos, micro-organismos.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS *ANNONA MURICATA* L. (ANNONACEAE)

ABSTRACT – Currently there is a high rate of micro-organisms that have become resistant to conventional therapy, this resistance tends to increase with the inappropriate use of antimicrobials. This made the search for new active substances were intensified. Based on the foregoing, the aim of this study was to evaluate the antibacterial potential *in vitro* of aqueous and hydroalcoholic extracts of bark, leaves and fruit of *Annona muricata* L. (soursop) compared to the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity of extracts of soursop was determined by diffusion plate with Mueller-Hinton Agar using the disk diffusion method against strains tested. The paper discs were impregnated with 20 µL of the extracts at concentrations of 100, 50, 25, 12,5 and 6,25%. The tests were performed in duplicate and the plates were incubated in a 37°C/24h, with readings taken after this period by measuring the growth inhibition halos. It was found that the hydroalcoholic and aqueous extracts have proven ineffective in the face of micro-organisms in the dilutions tested. We suggest the development of new studies using other methods of

¹Aluno do Curso de Farmácia/Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Universitário, 58109-753-753, Campina Grande-PB. Email: francinaldofarmacia@gmail.com

²Prof^a do Departamento de Farmácia, UEPB, Campus Universitário, 58109-753-753, Campina Grande-PB.

Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Atividade Antimicrobiana (LPAA) do Departamento de Farmácia, UEPB, Campus Universitário, 58109-753, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

spreading the plant extract, as well as the use of extracts with other solvents against fungi and bacterial strains.

Uniterms: Microbial resistance, soursop, hydroalcoholic, aqueous, microorganisms.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos continuam ganhando a batalha nas doenças infecciosas acarretando morte, apesar da disponibilidade de antibióticos eficazes. Uma das causas dessa situação consiste no surgimento e disseminação de resistência microbiana, que tende a aumentar com o uso inadequado e/ou indiscriminado de antimicrobianos (França & Costa, 2006).

Nos últimos anos, segundo Pereira (2007), após o uso excessivo de medicamentos antimicrobianos pela população, houve um grande índice de micro-organismos que se tornaram resistentes à terapia convencional. Isso fez com que a pesquisa de novas substâncias ativas para combater infecções, tanto em fontes animais como vegetais, fosse intensificada.

Estima-se que mais de 4.000 espécies vegetais sejam usadas para fins medicinais, resultado da observação e manejo da flora por povos tradicionais (Pereira, 2007). Atualmente, diversos fitoconstituintes já são conhecidos e estudos feitos em modelos experimentais são empregados no sentido de entender suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* (Catão et al., 2006).

A Annonaceae é uma família essencialmente tropical e subtropical e compreende aproximadamente 2.500 espécies (Santos-Andrade, s.d). Os gêneros mais comuns são *Annona*, *Guatteria*, *Xylopi*a e *Rollini* (Rinaldi, 2007). No Brasil, foram registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 260 espécies (Pontes et al., 2004; Lobão et al., 2005; Lima-Brito et al., 2006). Algumas espécies são usadas na medicina popular para várias finalidades e estudos químicos e farmacológicos, apesar de escassos, têm demonstrado que algumas espécies apresentam importantes compostos bioativos (Pinheiro et al., 2009a, b; Siebra et al., 2009).

Conhecida principalmente por seus frutos comestíveis, tais como a fruta do conde ou ata (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.), algumas espécies fornecem madeira própria para carpintaria e raízes utilizáveis como cortiça (*A. glabra* L., *A. crassiflora* Mart.); outras são consideradas medicinais (*A. spinescens* Mart., *A. foetida* Mart.) e ornamentais (*A. cacans* Warm. e *Xylopi*a *sericea* A.St.-Hil.) (Lobão et al., 2005; Rinaldi, 2007).

Annona muricata L. (graviola) é uma árvore pequena, que mede entre 5 e 6 m de altura e permanece viçosa ao longo do ano, com folhas largas de cor verde escuro, de aparência tenra e brilhante. O fruto - graviola - possui cor amarelo esverdeada, espesso e comestível que possui entre 15-23 cm de diâmetro, em forma de coração, com polpa mucilaginosa branca e levemente ácida. A semente com 1 a 2 cm de comprimento é preta na sua retirada do fruto passando a marrom dias após; de ordinário encontra-se 100 sementes por fruto. É originária da América tropical, e encontrada em todos Estados brasileiros, mas principalmente no Nordeste (Sacramento et al., 2003; Melo, 2006; Nova, 2008).

Todas as partes deste vegetal são utilizadas na medicina popular. As sementes são consideradas adstringentes, eméticas, e estudos confirmaram a atividade antiparasitária, moluscicida e antivírus *Herpes simplex*, ao mesmo tempo em que se atribuem às cascas, ação antidiabética e espasmolítica. A utilização do suco do fruto da *Annona muricata* L., é usado em bochechos no combate às aftas, internamente como antitérmico, diurético e no combate de insônias leves. A infusão das folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor. O decocto das folhas contém o óleo essencial com ação parasiticida, antirreumática e antinevrálgica (Gonçalves, 2007; Nova, 2008; Luna et al., s.d).

Seu estudo fitoquímico mostrou que o fruto e as folhas de *Annona muricata* L. possuem diversos compostos com atividade farmacológica tais como, alcalóides, esteróides, triterpenos e

taninos. Nas sementes, foram registradas o ciclopeptídeo anomuricatina A e várias acetogeninas sendo farmacologicamente ativas contra células tumorais (Gonçalves, 2007; Nova, 2008; Ferelli, s.d).

Há poucos registros pertinentes na literatura, quanto ao possível mecanismo de ação de produtos oriundos de plantas. Entretanto, sabe-se que algumas substâncias naturais possuem grande capacidade para inibir a síntese dos ácidos nucleicos, interferindo na formação de purina ou pirimidina, ou, ainda, bloqueando a polimerização dos nucleotídeos; ao mesmo tempo, estudos sobre a atividade de extratos vegetais e seu mecanismo de ação têm demonstrado que eles agem nas estruturas da parede celular (Gonçalves, 2007).

O estudo da resistência microbiana, geralmente é baseado em micro-organismos de importância epidemiológica. Dentre estes, podemos citar as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (Antunes et al., 2006).

O gênero *Staphylococcus*, pertence à família Micrococaceae; são cocos Gram-positivos, imóveis, arrumados em massas irregulares ou em cachos de uva, anaeróbios facultativos ou aeróbios, catalase positivos e apresentam diversas espécies (Baralho, 2011). O *Staphylococcus aureus* caracteriza-se por apresentar proteína A e enzima coagulase. É considerado como um patógeno causador de abscessos, infecções piogênicas (endocardites e ostiomielites), intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (Estevan, 2005; Trabulsi & Alterthum, 2005). Este micro-organismo tem ocupado um lugar de destaque na etiologia de infecções hospitalares sendo que aproximadamente 70% a 100% são causadas por amostras multirresistentes (Violante, 2008).

Outro gênero microbiano relevante é *Escherichia*. Esses micro-organismos ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (Pereira, 2007). *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete e que pertence à família das Enterobacteriaceae, podendo formar cadeias, sendo o principal agente causador de infecções no trato urinário e de sepse. É também uma das duas causas da meningite neonatal e o agente mais frequentemente associado com a "diarréia dos viajantes", uma diarréia aquosa (Levinson e Jawetz, 2005; Pelczar et al., 2005; Violante, 2008).

Quanto ao gênero *Pseudomonas*, este consiste em bastonetes Gram-negativos não fermentadores, aeróbicos e móveis, alguns dos quais produzem pigmentos hidrossolúveis. As *Pseudomonas* são encontradas amplamente no solo, na água, nas plantas e nos animais (Jawetz et al., 1998). Dentre as várias espécies, a *Pseudomonas aeruginosa*, destaca-se pela elevada resistência aos antimicrobianos e por causar infecções em indivíduos imunocompetentes (raramente). Porém, é considerado um micro-organismo oportunista além de ser também um dos principais agentes de infecções em indivíduos com defesas diminuídas. O trato gastrointestinal é o principal sítio de colonização e reservatório de *P. aeruginosa* podendo ser encontrada também em outros locais úmidos do corpo, como orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo (Soares, 2005).

Não há dúvidas de que as plantas são excelentes fontes de substâncias fitoquímicas, com propriedades biologicamente ativas, além de serem, todas biodegradáveis e, o mais importante, com planejamento adequado, serem também abundantes e renováveis (Gonçalves, 2007). Pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas representam um grande desafio para a descoberta, isolamento e identificação de fármacos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroalcolólicos e aquosos da casca, folhas e fruto da *Annona muricata* L. frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico

O material vegetal (casca do caule e folhas) da *Annona muricata* L. foi coletado na Zona Rural do município de Serra Branca – PB, situado na região do cariri Paraibano, entre 8 e 9h da manhã, nos meses de maio e junho de 2011. Enquanto que o fruto (graviola) foi adquirido comercialmente na cidade de Campina Grande – PB, no mesmo período. A espécie foi identificada e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Arruda Câmara da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, sob o n° 908.

Obtenção dos Extratos

Os extratos hidroalcoólicos e aquosos foram preparados na Farmácia Homeopática Gral & Cia e no Laboratório de Fitoterapia/Departamento de Farmácia/UEPB, respectivamente, sob supervisão da Professora Rossana Miranda Pessoa Antunes, segundo as recomendações da Farmacopéia Brasileira (1959) e adaptações de Silva et al. (2006) e Silva (2008).

Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos a partir da planta fresca pelo processo de maceração a frio. Sendo utilizados 200g do material vegetal para cada 200 mL de álcool etílico 70%.

Inicialmente, cascas, folhas e fruto foram devidamente selecionados, higienizados, pesados em balança eletrônica, triturados em liquidificador doméstico e acondicionados em embalagens de vidro com tampa rosqueada/sete dias com o solvente extrator, sendo agitados periodicamente. Após esse período, os mesmos foram filtrados em pano limpo com malha de 2 mm, obtendo-se uma concentração ao nível de extrato fluído de 1:1 (p/v), sendo acondicionados em recipientes apropriados de vidro âmbar.

Para obtenção dos extratos aquosos, obedeceu-se à proporção de 25g do material vegetal para 100 mL de água destilada. Cada material coletado (cascas, folhas e fruto) foi triturado em liquidificador doméstico/três minutos, deixando em repouso por 2 horas. Decorrido este período, os extratos foram filtrados em pano limpo com malha 2 mm e, em seguida, colocadas em recipientes de vidro âmbar para serem utilizadas. Obteve-se assim, extratos aquosos a 25%.

Análise Microbiológica

Para o estudo foram utilizados cepas padrão provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

A fim de obter a viabilidade dos micro-organismos, utilizou-se o Caldo de enriquecimento BHI (Brain Heart Infusion) e, para o cultivo bacteriano, o meio Ágar Müller-Hinton, sendo vertidos 25 mL/placa de Petri/ 90 x 15 mm e preparados de acordo com as recomendações do fabricante DIFICO®.

A partir do crescimento em Ágar Müller-Hinton após 24h/37°C, os inóculos foram preparados repicando-se de duas a quatro colônias em 1 mL de solução salina 0,85% estéril, comparando-se a turbidez com o tubo n° 0,5 da escala McFarland a fim de se obter cerca de 10⁶ UFC.mL⁻¹ (CLSI, 2005).

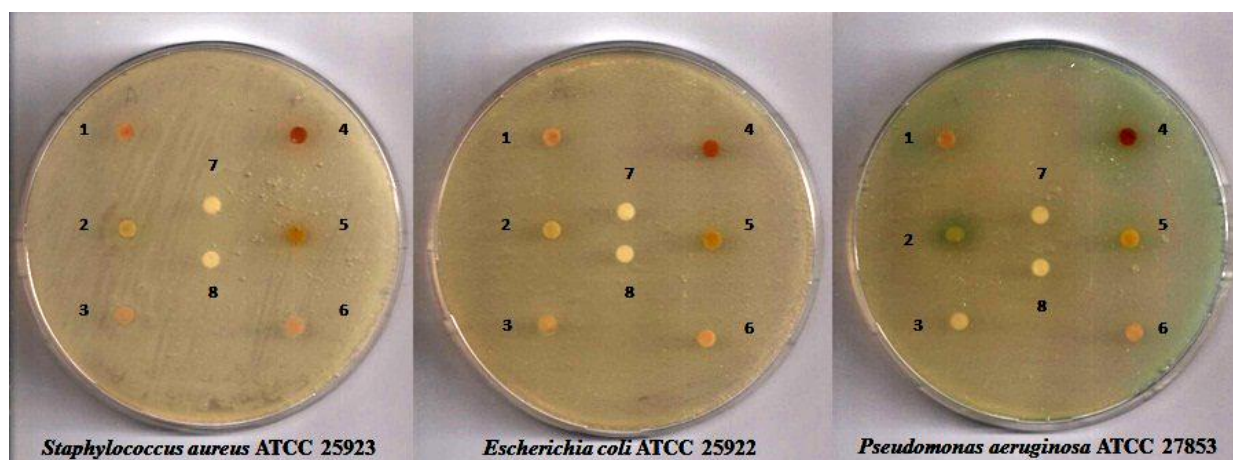
Para inoculação dos micro-organismos, utilizou-se a técnica de difusão em disco, semeando-se a suspensão bacteriana, com auxílio de *swab* estéril, por toda superfície do Ágar Müller-Hinton, de modo a se obter um crescimento confluyente e uniforme. Após este procedimento, com auxílio de uma pinça esterilizada, foram inoculados discos de papel filtro estéreis previamente impregnados com 20 µL dos referidos extratos nas suas formas concentradas (100%) e nas diluições 50; 25; 12,5 e 6,25%. Como controle negativo, utilizou-se, para os extratos hidroalcoólicos, álcool 70% e, para os extratos aquosos, água destilada. Em

seguida as placas foram incubadas à 37°C/24h. Os ensaios foram realizados em duplicatas, e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição obtidos nas duas repetições.

A atividade biológica do produto foi considerada positiva quando a média dos halos de inibição foi igual ou superior a 8 mm de diâmetro (Sakar et al., 1988; Wong-Leung, 1988; Naqui et al., 1991; Catão, 2007; Catão et al., 2010; Palmeira et al., 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os extratos hidroalcoólicos e aquosos da casa, folhas e fruto da graviola, após o ensaio por disco difusão demonstraram ausência de atividade antibacteriana frente às cepas analisadas, visto que não foi observada a formação de halos de inibição de crescimento ao redor dos discos embebidos com nenhum dos extratos testados (Figura 1).



Legenda: 1 – Extrato aquoso da casca, 2 – Extrato aquoso das folhas, 3 – Extrato aquoso do fruto, 4 – Extrato hidroalcoólico da casca, 5 – Extrato hidroalcoólico das folhas, 6 – Extrato hidroalcoólico do fruto, 7 – Controle negativo para o extrato aquoso (água destilada) e 8 – Controle negativo para o extrato hidroalcoólico (álcool 70%).

Figura 1 – Ensaio de atividade antibacteriana dos extratos aquosos e hidroalcoólicos da graviola na concentração inicial (100%) frente às cepas ATCC

Observou-se que o solvente, álcool 70% para os extratos hidroalcoólicos e a água destilada para os extratos aquosos, utilizadas como controle negativo, não interferiram no crescimento das cepas ATCC testadas.

Estes resultados estão em concordância com os relatados por Pedroso & Lunardello (s.d), em estudos semelhantes quando realizaram investigações sobre a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos dos frutos de *Annona muricata* L. pelo método de difusão em disco, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Estes autores também observaram que o extrato bruto do fruto não apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. Porém os mesmos não investigaram o potencial antibacteriano da casca, nem tampouco das folhas da graviola.

Frame et al. (1998), em estudo utilizando extrato hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* L., provenientes de Porto Rico, empregando o método da difusão em ágar, encontraram resistência frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Por sua vez, Chariandy et al. (1999), utilizando extrato hidroalcoólico de folhas oriundas de Trindade e Tobago, com o método da difusão em ágar, encontraram resistência frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*.

Em contrapartida, estudos realizados na Índia por Pathak et al. (2010), avaliaram o efeito antimicrobiano dos extratos metanólicos e aquosos das folhas de mudas de graviola frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia* e *Enterobacter aerogenes*. Verificou-se sensibilidade frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*). Os autores sugeriram o uso da *Annona muricata* L. no tratamento de doenças causadas por tais patógenos.

Vieira et al. (2010), avaliando o potencial bactericida de extratos aquosos e etanólicos de sementes de moringa (*Moringa oleifera*) e casca de graviola (*Annona muricata* L.) frente a *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, mostraram que os extratos aquosos de graviola apresentaram efeito bactericida frente a *S.aureus* e *V.cholerae*, entretanto, os extratos etanólicos dessa planta não mostraram atividade antibacteriana. Estes autores encontraram resultados divergentes em relação aos encontrados neste estudo, porém este fato pode estar associado ao modo de preparo dos extratos assim como também a linhagem microbiana analisada.

De acordo com Martins et al. (2010), trabalhos com uma mesma planta apresentam resultados distintos em relação à atividade antimicrobiana, às vezes até mesmo discrepantes. De modo que é importante observar se foram utilizadas as mesmas condições experimentais, dentre elas: o solvente utilizado para extração, a temperatura e tempo de incubação e micro-organismos testados. É importante ressaltar que as técnicas e modificações empregadas nos métodos de *screening* para avaliar a atividade antimicrobiana por diferentes autores podem ser fatores determinantes nestas variações.

Tanto para Auricchio & Bacchi (2003) quanto para Nascimento et al. (2008), quando se comparam estudos de plantas medicinais, é notória a dificuldade de avaliação entre os resultados, pois a constituição química de espécies vegetais pode ser influenciada qualitativamente e quantitativamente por variações climáticas e localização geográfica. Além disso, o estágio de desenvolvimento do vegetal quando da sua coleta, parte da planta estudada, forma de preparar o material, até protocolos seguidos nos experimentos também podem repercutir diretamente sobre sua atividade biológica. Supõe-se que alguns desses fatores possam ter influenciado os resultados encontrados neste estudo.

Outra possível explicação para inatividade dos extratos testados e relatados neste estudo reside na sua provável dificuldade de difusão no meio de cultura, quando impregnados nos discos de papel filtro. Segundo Violante (2008), dentre os métodos disponíveis para determinação da atividade antimicrobiana, os mais utilizados são: difusão em ágar, diluição (macro e microdiluições) e bioautográficos. Dentre estes, o ensaio por difusão é o que apresenta maiores problemas, pois muitas substâncias não se difundem bem no meio de cultura, interferindo assim, de forma significativa, na formação e no tamanho dos halos de inibição de crescimento. De modo que para se afirmar, categoricamente, que um determinado produto é inativo, ou seja, que não apresenta atividade antibacteriana, o ideal seria que o mesmo fosse testado por mais de uma metodologia.

Martins et al. (2010) complementam que, os extratos de plantas frequentemente tem baixas propriedades de difusão, e que a técnica de diluição em caldo é a melhor maneira de estabelecer a real potência de um composto puro, na qual a solubilidade é o requisito que otimiza os resultados. Sendo assim, novos estudos envolvendo outras metodologias devem ser investigados.

CONCLUSÕES

De acordo com estes resultados, nas condições experimentais utilizadas para a avaliação do potencial antibacteriano da graviola, concluiu-se que:

- Os extratos hidroalcoólicos e aquosos da casca, folhas e fruto da graviola mostraram-se inativos frente aos micro-organismos testados;
- Vários fatores podem ter influenciado o estudo, desde as condições climáticas e localização geográfica da espécie, até a difusibilidade do extrato utilizado no experimento;
- É notória a necessidade de se padronizar e aprofundar as diferentes metodologias de avaliação, com o intuito de corroborar e assegurar estes resultados;
- Sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas utilizando outros métodos de difusão do extrato vegetal, bem como a utilização de extratos obtidos com outros solventes além de outras linhagens bacterianas e fúngicas, aliados a ensaios de toxicidade aguda.

REFERÊNCIAS

- Antunes, R.M.P. et al. (2006). Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4): 517-524.
- Auricchio, M.T, Bacchi, E.M . (2003). Folhas de *Eugenia uniflora* (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 62(1): 55-61.
- Barbalho, T. C. F.; Mota, R. A. (2011). Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2(2):b31-36.
- Bauer, A.W.M.M.; Kirky, J.C.; Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(3): 493-496.
- Catão, R.M.R. (2007). *Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas I, II e III sobre bactérias e fungos leveduriformes*. 126p. Tese de Doutorado - UFPB, João Pessoa. – PB.
- Catão, R.M.R.; Antunes, R.M.P; Arruda, T.A.; Pereira, M.S.V; Higino, J.S.; Alves, J. A.; Passos, M.G.V.M.; Santos, V.L. (2006). Atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 38(2): 111-114.
- Catão, R.M.R.; Barbosa-Filho, J.M.; Lima, E. O.; Pereira, M.S.V.; Silva, M.A. R.S.; Arruda, T.A.; Antunes, R.M.P. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42(1): 9-14.
- Chariandy, C.M.; Seaforth, C.E.; Phelps, R.H.; Pollard, G.V. (1999). Screening of medicinal planta from Trinidad and Tobago for antimicrobial and isecticidal properties. *Journal of Ethnofarmacology*, 64(3): 265-270.
- Clinical Laboratory Standards Institut – CLSI. (2005). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. 23(1).
- Estevan, T.A. (2005). (s.d). *Avaliação da resistência ou sensibilidade de Staphylococcus sp. perante ao uso do antibiótico vancomicina*. 27p. (Monografia de Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos.

Farmacopéia Brasileira. (1959). 2^a ed. São Paulo: Siqueira.

Ferelli, C. (s.d). *Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Graviola (Annona Muricata) e Suas Frações* - <http://www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/4mostra/pdfs/172.pdf>. Acessado em 01 de junho de 2011.

Frame, A.D.; Riosolivares, E.; De Jesus, L.; Ortiz, D.; Pagan, J. (1998). Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *Health Science Journal*, 17(2): 248-253.

França, F.B.; Costa, A.C. (2006). Perfil farmacoterapêutico de pacientes em uso de antimicrobianos em hospital privado, em Fortaleza – CE. *Revista Brasileira de Promoção da Saúde*, 19(4): 224-228.

Gonçalves, A.L. (2007). *Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais*. 209p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Paulista.

Jawetz, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A. (1998). *Microbiologia Médica*. 20 ed. São Paulo: Guanabara Koogan.

Levinson, W.; Jawetz, E. (2005). *Microbiologia Médica e Imunologia*. 7 ed. Porto Alegre: Artmed.

Lima-Brito, A.; Campos, V.C.A.; Santana, J.R.F.; Dornelles, A.L.C. (2006). Efeito do ácido giberélico (GA) na emergência de plântulas de *Annona crassiflora* Mart., *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. *Magistra, Cruz das Almas-BA*, 18(1): 27-33.

Lobão, A.Q.; Araújo, D.S.D.; Kurtz, B.C. (2005). Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 56 (87): 85-96.

Luna, A.F.; Freitas, T.M.B.; Alves, I.C.; Pinto, C.E.M.; Luz, E.W.M. (s.d). *Atividade fitoquímica e antioxidante da folha Annona muricata L. frente ao radical ABTS* - <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNepi2010/paper/view/1003>. Acessado em 01 de junho de 2011.

Martins, C.H.G.; Souza, F.R.; Fonseca, C.; Casemiro, L.A.; Furtado, N.A.J.C.; Ambrosio, S. R.; Cunha, W.R. (2010). Determinação *in vitro* da atividade antibacteriana dos extratos brutos da casca e polpa farinácea de *Hymenaea courbaril* L. *Revista Investigação*, 10(1): 37-43.

Melo, B.S.C. (2006). *Avaliação do potencial inseticida de produtos naturais e sintéticos no controle das brocas da graviola*. 61p. Dissertação de Mestrado em Agronomia/Fitotecnia – Universidade Federal do Ceará.

Naqui, S.H.; Kilian, M.S.Y.; Vohora, S.B. (1991). Anti-bacterial, anti-fungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 62(3): 221-228.

Nascimento, J.E.; Melo, A.F.M.; Lima e Silva, T.C.; Veras Filho, J.; Santos, E.M.; Albuquerque, U. P.; Amrim, E. L.C. (2008). Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente

a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29(2): 145-150.

Nova, N.S.V. (2008). *Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de Annonaceae do Estado de Ceará*. 71p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

Palmeira, J.D.; Ferreira, S.B.; Souza, J.H.; Almeida, J.M.; Figueiredo, M.C.; Pequeno, A.S.; Arruda, T.A.; Antunes, R.M.P.; Catão, R.M.R. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42(1): 33-37.

Pathak, P; Saraswathy, Dr.; Vora, A.; Savai, I. (2010). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of the leaves of *Annona muricata*. *International Journal Of Pharmaceutical Research And Development*. (online). 2(3) - <http://www.ijprd.com/IN%20VITRO%20ANTIMICROBIAL%20ACTIVITY%20AND%20PHYTOCHEMICAL%20ANALYSIS%20OF%20THE%20LEAVES%20OF%20Annona%20muricata.pdf>. Acessado em 01 de junho de 2011.

Pedroso, I. A.; Lunardello, M.A. (s.d). *Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas e frutos de Annona muricata L.* - ftp://ftp.usjt.br/pub/revistaic/pag49_edi02.pdf. Acessado em 01 de junho de 2011.

Pelczar Jr., M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. (2005). *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2 ed. São Paulo: Pearson Makron Books.

Pereira, J.F.S. (2007). *Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da casca de Schinopsis brasiliensis Engler: um estudo baseado na indicação etnofarmacológica*. 60p. (Monografia de Graduação em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

Pinheiro, M.L.B. et al. (2009a). Constituintes Químicos de *Annona amazonica* R.E. Fries (Annonaceae). In: 32^a *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Fortaleza – CE.

Pinheiro, M.L.B. et al. (2009b). Alcalóides das folhas de *Rollinia mucosa* (Annonaceae). In: 32^a *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Fortaleza – CE.

Pontes, A. F.; Barbosa, M. R. V.; Maas, P. J. M. (2004). Flora Paraibana: Annonaceae Juss. *Acta Botanica Brasilica*, 18(2): 281-293.

Rinaldi, M.V.N. (2007). *Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de Annona hypoglauca Mart.* 125p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Sacramento, C.K; Farias, J.C.; Cruz, F.L. et al. (2003). Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(2): 329-331.

Sakar, M.K.; Tamer, A.V.; Tokour, S. (1988). Antimicrobial activities of some Hypericum species growing in Turkey. *Fitoterapia*, 59(1): 49-52.

Santos-Andrade, F.G.; Maia, A.C.D.; Schlindwein, C. (s.d). *Polinização da gravioleira (Annona muricata L., Annonaceae) na Zona da Mata em Pernambuco* - <http://www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/262a.pdf>. Acessado em 24 de fevereiro de 2011.

Siebra, C.A.; Nardin, J.M.; Florão, A.; Rocha, F.H.; Bastos, D.Z.; Oliveira, B.H.; Weffort-Santos, A.M. (2009). Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1): 82-88.

Silva, F.S. (2008). *Eficiência anti-helmíntica in vitro do extrato aquoso de mastruz (Chenopodium ambrosioides L.)*. 20p. (Monografia do Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande-PB.

Silva, W.A.; Nobre, A.P.; Siva, M.S.C.; Rodrigues, O.G.; Lucas, R.C. (2006). Efeito alelopático de extrato aquoso de *Amburana cearensis* A. Smith na germinação e crescimento de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). *Agropecuária Científica no Semi-árido*, 2(1): Set – Dez.

Soares, M.C.S.T. (2005). *Estuda da resistência aos antimicrobianos em amostras de Pseudomonas aeruginosa isoladas em hospitais de Niterói – RJ*. 78p. Dissertação de Pós – graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense.

Trabulsi. L.R.; Alterthum, F. (2005). *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Atheneu.

Vieira, G.H.F.; Mourão, J.A.; Ângelo, A.M.; Costa, R.A. & Vieira, R.H.S.F. (2010). Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista Instituto Medicina Tropical*, 52(3): 129-32.

Violante, I.M.P. (2008). *Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste*. 72p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Wong-Leung, Y.L. (1988). Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in Chinese medicine. *Fitoterapia*, 69(1): 11-16.